Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg.
(Direktor: Prof. Dr. F. Klewitz)

Beitrag zur chemischen Konstitution der eosinophilen Leukozytengranula.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der Gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Kurt Heinz Pimper

aus Friedberg (Hessen)

Marburg 1934

Buchdruckerei Wilhelm Lang, Friedberg in Hessen, Kaiserstrasse 63

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 19. Oktober 1934.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Referent: Prof. Dr. Klewitz.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK

Beitrag zur chemischen Konstitution der eosinophilen Leukozytengranula.

Trotz zahlreicher Untersuchungen herrscht in der Literatur über die chemische Beschaffenheit der eosinophilen Leukozytengranula, über ihre Herkunft und biologische Bedeutung noch keineswegs eine einheitliche Auffassung. Teils glaubte man an Entstehung aus den Granulationen der Neutrophilen als Ausdruck eines vollzogenen Reifungsvorganges (H. F. Müller, Rieder), teils aus denen der basophilen Leukozyten (Pappenheim)[1]) (Hirschfeld), während Ehrlich die „Konstanz der Granulationen" in den einzelnen Leukozytenarten verteidigte und die eosinophilen Granula als spezifische Zellprodukte, als „Zellsekrete" bezeichnete. Eiweißnatur lehnt Ehrlich ab.

Schleip beschreibt bei Trichinosis das Vorkommen von unreifen bei Jenner und Giemsa blauen Granula neben reifen.

Naegeli hat bei Helmintheneosinophilie neben normalen auch einzelne etwas matter gefärbte Körner gesehen, noch mit schwach angedeuteter Basophilie.

---

[1]) *Anmerkung: Pappenheim: „Meine Ueberzeugung geht also dahin, daß allerdings die ganze Art der eosinophilen Zellen sich ursprünglich von uninukleären granulationslosen basophilen Zellen einmal abgeleitet hat, daß aber die neutrophilen Spezialzellen weder mit den eosinophilen Zellen . ., noch mit den embryonalen Vorstufen dieser, den großen uninukleären Leukozyten, wie Ehrlich will, bzw. mit den körnchenfreien basophilen Leukozyten, wie Uskoff und Benda wollen, irgend etwas zu tun haben." Dann macht Pappenheim noch darauf aufmerksam, daß in klinischer Hinsicht eosinophile und basophile Granulationen mancherlei Gemeinsamkeiten aufwiesen: „Bei Milzausschaltung, bei mit Tänia saginata behafteten Personen, außerdem bei congenitaler Lues der Kinder, ferner innerhalb maligner Lymphome sind beide Arten von Zellen vermehrt, auch die Charcot-Leyden'schen Krystalle scheinen nicht nur von eosinophilen, sondern auch in körnchenfreien Zellen gebildet zu werden."*

St. Klein und Saltikow fanden reichliche eosinophile Zellen in Blutzerfallsherden und schlossen daraus auf eine hämoglobinogene Natur der Granula. Sie steliten sich vor, daß die neutrophilen Granulozyten das aus den zerfallenden Erythrozyten befreite Hämoglobin phagozytierten und dadurch zu eosinophilen Leukozyten würden.

Weidenreich hat noch immer diese Theorie eifrig verfochten, wird aber heute fast übereinstimmend von allen Autoren abgelehnt.

Morawitz: „Die Granula sind echte endogene Bildungen, nicht Derivate phagozytierten Hämoglobins, sondern Zellprodukte, die bereits in den Knochenmarkszellen präformiert sind.“ Phagozytierte Hämoglobingranula sähen anders aus, seien auch nie so gleichmäßig geformt wie die eosinophilen Granula.

Sacharoff ist der Ansicht, die eos. Körner seien durch Phagozytose der aus den Erythrozyten herausfallenden Elemente der Kernsubstanz entstanden und müßten sich deshalb aus Paranuklein oder degeneriertem Nuklein zusammensetzen.

E. Liebreich gewann aus dem bei zentrifugiertem langsam gerinnenden Blut sich eben bildenden Gerinnungshäutchen massenhaft eos. Zellen und gleichzeitig Charcot-Leyden'sche Kristalle. Das führte ihn zu dem Schluß, daß die Granula irgend eine Aufgabe bei der Blutgerinnung hätten. L. meint, daß die eos. Granula und die Charcot-Leydenschen Krystalle krystallisierte Sekrete in bezw. außerhalb bestimmter neutrophiler Leukozyten seien, und zwar sollen sie ein Bestandteil des Fibrins sein.

Neumann lehnt Liebreichs Hypothese ab. Gegen sie spricht auch die Beobachtung Petrys, daß durch Trypsinverdauung die neutrophilen und basophilen Leukozyten restlos aufgelöst werden, während die eosinophilen Granulationen selbst nach achttägiger Einwirkung in nirgendwie erkennbarer Weise verändert werden.

Ueberhaupt sind nach Petry die eosinophilen Granula außerordentlich widerstandsfähig. Siedehitze und selbst Erhitzen der lufttrockenen Deckglasausstriche der isolierten Granula auf 120° ließ außer erhöhter Klebrigkeit in der Wärme keinerlei physikalische, chemische oder färberische Veränderung der Gebilde erken-

nen. Sie wurden anscheinend nicht coaguliert. Ebensowenig vermögen Aethylalkohol, Methylalkohol, Aether, Chloroform, die verschiedenen Schwermetallsalze wie Quecksilberchlorid, Kupfersulfat Platinchlorid und längere Einwirkung von Ammoniumsulfatlösung, Pikrinsäure irgend eine erkennbare Veränderung zu setzen. Die Xanthoproteinreaktion fiel stets negativ aus, während die Millonsche Probe positiv war, was Petry jedoch nicht als zwingenden Beweis für eine Eiweißnatur ansieht, zumal die Granula in eiweißhaltiger Flüssigkeit suspendiert waren. Petry sagt: „Sollte es gelingen, eine positive Millonsche Reaktion auch von den aus der umgebenden eiweißhaltigen Flüssigkeit isolierten Granula zu bekommen, dann könnte es sich nur um ein aus der gewöhnlichen Reihe der Eiweißkörper fallendes Proteid oder um ein noch weiter abstehendes Eiweißderivat handeln. Es habe den Eindruck, daß die Granula Sekrete des Plasmas seien, vielleicht weniger deponierte Reservestoffe als Exkretionsstoffe.

Später hat dann Petry aus Pferdeknochenmark durch Trypsinverdauung weitgehend isolierte Granula verascht. Die chemische Analyse ergab 1,7% Schwefel, etwa 12,2% Stickstoff und durchschnittlich (schwankend) 11% Eisen. Ein Zusammenhang mit Hämoglobin konnte nicht erbracht werden. Die Teichmann'sche Häminprobe fiel stets negativ aus. Auf Grund dieser prozentualen Verteilung von Schwefel und Stickstoff hielt Petry einen Hinweis auf Eiweißnatur der Granula für gegeben. Es fehlten nur noch charakteristische Eiweißreaktionen. Diese gelangen in einer Lösung der Granula, die in siedender Kalilauge vorgenommen war, und zwar wurden Fällungen erzielt mit Pikrinsäure, Kupferacetat und Eisenchlorid. Die Lösung ergab sehr starke Millon-Reaktion. Ferner gelang der Nachweis von Leucin und Tyrosin. Hauptsächlich auf Grund dieser Arbeiten Petry's wurde von den meisten Autoren an der Eiweißnatur der eosinophilen Granula festgehalten. Zu beachten ist, daß die untersuchten Granula des Knochenmarkes Unterschiede gegenüber denen des Blutes aufwiesen. Am auffallendsten ist der Umstand, daß die Körnchen des Knochenmarkes bei Giemsa-Färbung deutlich basische Farbstoffe aufnehmen. Doch nimmt Petry Identität an wegen der bei beiden Arten auffallenden Resistenz gegen Fermente, und da er Uebergangsformen beobachten konnte.

Neumann hat ebenfalls Untersuchungen an den eosinophilen Granulozyten des Pferdeblutes gemacht. Er gibt im Gegensatz zu Petry Unlöslichkeit in 1%iger Natronlauge an und fand einen sehr wechselnden Stickstoffgehalt von 0—14%. Auch glückte Neumann der Nachweis von Leucin und Tyrosin. Der Eisengehalt kann nach Neumann ebenfalls sehr wechselnd sein. Er glaubt, daß die Granulasubstanz ein Gemenge verschiedener Bestandteile sei, in der Hauptsache handele es sich wohl um Lipoidkörper. Auch vermutet er, daß die eosinophilen Körnchen im strömenden Blute jedenfalls leicht löslich seien und erst nach dem Absterben der eosinophilen Zellen einen Erstarrungsprozeß durchmachten. Sie könnten deshalb in vivo sehr wohl wichtige Speicherfunktionen erfüllen.

Neumann bekundet hierin eine sehr ähnliche Anschauung, wie F. de Moulin, der die Granula aller weißen Blutzellen für Koagulierungsprodukte hält, die im Leben nicht vorhanden seien.

1922 hat Berg auf die Möglichkeit eines histochemischen Eiweiß- bezw. Eiweißabkömmlingnachweises durch das Diketohydrindenhydrat (Ninhydrin der Höchster Farbwerke) aufmerksam gemacht, nachdem es von Loew und Laserstein vorher schon in ähnlicher Weise angewandt worden war.

Abderhalden und andere Autoren empfehlen Diketohydrindenhydrat (= Ninhydrin) als ein äußerst scharfes Reagens auf alle Stoffe, welche in Stellung zum Carboxyl eine Aminogruppe tragen. Es reagiert außerordentlich fein auf Aminosäuren, Eiweißabbauprodukte und niedere Eiweißkörper, weniger empfindlich auf die komplizierter zusammengesetzten Eiweiße. Berg konnte mit Hilfe der Ninhydrinreaktion niedere Eiweißkörper in den Leberzellen und roten Blutkörperchen nachweisen, nachdem er die höheren, komplizierter zusammengesetzten durch Coagulation von der Reaktion ausgeschlossen hatte. Ihm fiel bei seinen Versuchen intensiv blaue Färbung der eosinophilen Granula im Gegensatz zu den Neutro- und Basophilen auf, doch ließ er die Entscheidung, ob es sich um eine echte Ninhydrineiweißreaktion handele, noch aus.

Klewitz und E. Krieger haben Bergs Methodik weiter ausgebaut und auf die eosinophilen Leukozyten des menschlichen Blutes und des Asthmasputums angewandt. Sie kamen zu dem Er-

gebnis, daß die blaue Färbung der eosinophilen Granula, welche Berg in seinen Blutpräparaten beobachtete, keine wirkliche Ninhydrinreaktion sei. Es handele sich hierbei vielmehr um eine sekundäre Färbung, welche dadurch zustande kommt, daß die niederen durch Fixation in Methylalkohol nicht koagulierten Eiweißkörper des Blutserums und in den Erythrozyten mit dem Ninhydrin reagieren und einen sauren, wasserlöslichen Farbstoff bilden, der von den acidophilen Granula erst sekundär aufgenommen wird. Sie mußten deshalb eine Eiweißstruktur der eosinophilen Granula ablehnen.

Trotzdem wird noch heute in der Literatur vor allem auf Grund der Arbeiten von Petry an der Eiweißgenese der Granula festgehalten.

Ich bin nun dem Problem noch einmal nachgegangen und habe die von Klewitz und E. Krieger seinerzeit angegebene Methodik auch zu meinen Versuchen angewandt. Danach wurden ziemlich dicke Ausstriche von zum Teil unverändertem, teils mit Citrat versetztem menschlichem Blute, das bei der Ausdifferenzierung nach May-Grünwald'scher Färbung Anwesenheit bis zu 12% eosinophiler Zellen ergeben hatte, drei Minuten lang in Methylalkohol fixiert und dann zwei bis drei Minuten in 0,2%iger Ninhydrinlösung gekocht. Mikroskopisch präsentierte sich das Präparat nach dieser Prozedur folgendermaßen:

Die Erythrozyten, die auf Grund des dicken Ausstrichs eine konfluierende Masse bildeten, waren dunkelblaugrün gefärbt bei Menschen-Präparaten mit einem Stich ins Violette. Die Leukozyten waren farblos, bis auf die Körner der eosinophilen Zellen, die sofort durch deutlichste, tiefblaue Tingierung auffielen. Im Ganzen wurden 28 Blutpräparate von 5 verschiedenen Personen mit erhöhter Eosinophilie (bis zu 12%) und 4 Ausstriche vom normalen Blute des Gesunden untersucht. Sämtliche Präparate zeigten das gleiche Verhalten. Fast alle färbte ich mit 12%iger Eosinlösung eine Minute lang nach, wobei die eosinophilen Granula, welche vorher rein tiefblau waren, einen dunkelvioletten Farbton annahmen. Niemals wurden Zellen mit nur roten Granulationen gefunden, was beweist, daß alle Eosinophile die blaue Farbe aufgenommen hatten. In drei Fällen wurden nach May-Grünwald gefärbte und mit Ninhydrin behandelte Präparate, die zu diesem Zwecke dünner aus-

gestrichen waren, ausgezählt und miteinander verglichen, wobei sich die Prozentzahlen der Eosinophilen in hohem Maße gegenseitig deckten.

Dieselbe Behandlung wurde vorgenommen mit Ausstrichen einer Emulsion von Leukozyten in Ringerlösung, welche wie folgt gewonnen wurde:

12 ccm Citratblut, das 12% (6%) eosinophile Zellen enthielt, wurde zentrifugiert, die Leukozytenschichte mit der Pipette herausgenommen und in 10 ccm Ringerlösung tüchtig durchgeschüttelt, dann wieder zentrifugiert und der Vorgang solange wiederholt, bis die nach dem Zentrifugieren überstehende Ringerlösung beim Kochen mit Ninhydrin keine blaue Färbung mehr ergab. Dann wurden die Leukozyten in 2 ccm Ringerlösung nochmals suspendiert und in gleichmäßiger Schicht auf dem Objektträger ausgestrichen. Hierbei blieben die eosinophilen Granula völlig ungefärbt.

Ebenso fiel die Ninhydrinreaktion vollkommen negativ aus bei der Untersuchung frischen Sputums von Asthma-bronchiale Kranken, welches mikroskopisch nach May-Grünwaldfärbung Anwesenheit zahlreicher eosinophiler Zellen erkennen ließ. Das Sputum wurde genau so wie die Blutpräparate nach Essigsäurefällung des Muzins[2]) in reichlich dicker Schicht auf einen Objektträger aufgestrichen, an der Luft trocknen gelassen, drei Minuten in Methylalkohol fixiert, (einige Ausstriche wurden statt dessen drei mal durch die Flamme gezogen, andere überhaupt nicht fixiert) und dann ein bis zwei Minuten in 0,2prozentiger Ninhydrinlösung gekocht.

Nur bei zwei Asthmatikern waren die eosinophilen Granula im Auswurf nach der Ninhydrinprobe mehr oder weniger deutlich blau gefärbt. Doch zeigte die nähere Untersuchung, daß dieses Sputum andere Eiweißkörper gelöst enthielt. Der durch Zentrifugieren von den Zellen gelöste Speichel gab im Reagenzglas makroskopisch deutliche Ninhydrinreaktion, während sie bei den in Ringerlösung gewaschenen Eosinophilen desselben negativ ausfiel.

Der Einwand, daß das Ninhydrin vielleicht nicht in die Granula hätte eindringen können, wird dadurch entkräftet, daß der blaue

[2]) *Ist in den meisten Fällen nicht nötig.*

Farbstoff, welcher entsteht, wenn man Ninhydrinlösung mit geringen Mengen Blutserum kocht, von den Granula begierig aufgenommen wird.

Andererseits kann auch die Ringerlösung den Ausfall der Probe nicht beeinflußt haben, da Zusatz nur minimaler Mengen von Serumeiweiß genügten, um deutlichste Färbung erscheinen zu lassen. Brachte ich nämlich zu den Ausstrichen, sowohl serumfreier Leukozytenemulsion als auch von Asthmasputum einen Tropfen gewöhnliches Blutserum, bevor die Ninhydrinreaktion angestellt wurde, so waren nachher die eosinophilen Granula im Bereich dieses Serumtropfens tief blau gefärbt. Nach außen hin nahm die Tiefe der Farbe immer mehr ab, bis jegliche Tingierung verschwand. Es ergibt sich also hieraus der Schluß, den auch früher schon Eva Krieger gezogen hatte, daß die vorher beschriebene Blaufärbung eine „Secundärfärbung" ist und nicht als Ninhydrineiweißreaktion gewertet werden darf.

In den eosinophilen Granula des Menschen kann jedenfalls kein Körper mit Eiweißstruktur vorhanden sein.

Die Analysen Petrys und Neumanns wurden jedoch an den eosinophilen Granula des Pferdeblutes bezw. -Knochenmarkes vorgenommen. Indessen wird von den meisten Autoren immer wieder betont, daß das gleiche färberische Verhalten keineswegs chemische Identität zwischen den verschiedenen untersuchten Gebilden bedeute. Ich weise nur darauf hin, daß die Charcot-Leydenschen Krystalle, welche allem Anschein nach aus den eosinophilen Körnern entstehen, bisher nur beim Menschen beobachtet werden konnten.

Um eine Differenz zwischen den menschlichen und den eosinophilen Granula des Pferdes nicht zu übersehen, habe ich die Ninhydrinreaktion auch an den eosinophilen Zellen des Pferdeblutes angestellt. Sie verhielten sich hierbei gegenüber denen des Menschen vollkommen gleich: Im gewöhnlichen, drei Minuten in Methylalkohol fixierten Blutausstrich nahmen sie tiefblaue Farbe an, wenn man sie eine Minute lang in Ninhydrinlösung kochte. Genau so verhielten sich die Granula der massenhaften eosinophilen Zellen von sogenanntem Speckgerinsel, welches bei der Heilserum-

gewinnung zurückbleibt. Hier gelang es nicht, die Präparate so vollkommen eiweißfrei zu bekommen, daß ein negativer Ausfall der Probe erzielt wurde. Dagegen war die Ninhydrinprobe bei den in Ringerlösung suspendierten und wiederholt gewaschenen eosinophilen Pferde-Leukozyten negativ. Zusatz von Serumspuren und in geringerem Maße auch von Erythrozyten, ließ in deren Bereich Blaufärbung erscheinen. Es konnte sich deshalb beim Pferdeblut auch nur um denselben Vorgang einer sekundären Färbung handeln, wie er für die menschlichen Eosinophilen oben beschrieben wurde.

Wegen der abweichenden Eigenschaften der eosinophilen Substanz (Resistenz gegen Fermente, mangelnde Koagulierbarkeit) hat Petry angenommen, daß sie aus einem aus der gewöhnlichen Reihe der Eiweißkörper fallenden Proteid bestände, und zwar sollte es sich um Elastin oder ein ihm sehr nahe stehendes Derivat handeln.

Demgegenüber ergaben meine Versuche mit Reinsubstanzen von Elastin und Keratin, daß diese Stoffe, auch nach dreiminütiger Behandlung in Methylalkohol nach einminutenlangem Kochen in 0,2%iger Ninhydrinlösung sich deutlich blau färbten. Auch fällt die Xanthoproteinprobe bei diesen Körpern stets positiv aus, während beide Reaktionen auf die gereinigten eosinophilen Granula angewandt, stets negativ waren.

Wenn auch die von Petry gefundene summarische Formel der Elemente — (von der Differenz des Stickstoffgehaltes bei Neumanns Untersuchungen abgesehen) — ungefähr der von Eiweiß entspricht, und man sie für die eosinophile Substanz anerkennt und nicht auf unvollkommene Isolierung oder Verunreinigung des untersuchten Materials zurückführt, kann doch ihre gegenseitige Bindung nicht dem Aufbau von Eiweißkörpern — auch nicht in weiterem Sinne (Elastin, Keratin) — entsprechen.

Zusammenfassung.

1. Die eosinophile Substanz in den eosinophilen Blutzellen des Menschen besteht nicht aus Eiweiß,

2. auch nicht aus weiter abstehenden noch als Eiweiß zu bezeichnenden Körpern wie Elastin und Keratin.

3. Die eosinophilen Granula des Menschenblutes verhalten sich bezüglich ihrer Nichteiweißnatur gleich wie die des Pferdes, für welche ebenfalls proteidartige Konstitution auszuschließen ist.

Anhang.

Außer der Ninhydrinreaktion habe ich noch versucht, die Millonsche Reaktion heranzuziehen. Doch war mir leider die Literatur über die Methodik ihrer histo-chemischen Anwendung nicht zugänglich, sodaß der negative Ausfall der Probe vielleicht auf falscher Arbeitsweise beruht.

Ich bin so vorgegangen: Die Blut- bezw. Sputumausstriche wurden drei Minuten in Methylalkohol fixiert oder durch die Flamme gezogen, dann wurden sie in Millons-Reagenslösung gekocht und zwar wurden auf etwa 3 ccm aqua dest. 10 gtt. Millons Reagens genommen. Auch versuchte ich, in unverdünntem Reagens die Präparate zu kochen, doch kam niemals Rotfärbung der Granula zustande. Wenn ich Serum mit denselben Lösungen im Reagenzglas kochte, entstand stets intensive Rotfärbung.

Zum Schlusse möchte ich Herrn Prof. Dr. Klewitz für die Ueberlassung des Themas, sowie für Anregungen zu dieser Arbeit meinen ergebensten Dank aussprechen. Gleichzeitig danke ich Herrn Prof. Dr. Kutscher für Ueberlassung von Reinsubstanzen von Elastin und Keratin, Herrn Prof. Dr. Schmidt-Schleicher für Pferdeblut und Leucozytenemulsion und Herrn Dr. Michalowsky für freundliche Hilfe.

Literaturverzeichnis.

Abderhalden: Abwehrfermente. Berlin 1914.

Berg W.: Ueber Anwendung der Ninhydrinreaktion auf mikroskopische Präparate zum Nachweis niederer Eiweißkörper. (Pflügers Arch. f. d. ges. Physiologie. 195.)

Hoppe-Seyler-Thierfelder.

Klewitz-Krieger: Kliwo. 1923 Bd. II.

Krieger, E.: Beitrag zur Kenntnis der eosinophilen Zellen. Dissertation Königsberg 1923.

Laserstein: Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie. 1915, Nr. 32.

Loew: Biochem. Zeitschr. 1915, Nr. 69.

Morawitz: Bergmanns Handbuch der Inneren Medizin. 1926 Bd. 4.

Naegeli: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. 5. Aufl. Berlin 1931.

Neumann: Handbuch der Hämatologie. 1933.

Pappenheim: Virchows Archiv 159.

Petry: Biochem. Zeitschrift 38.

Petry: Münchener Med. Wochschr. 1912.

Petry: Chemie der eosinophilen Granula. (Wiener Kli. Wo. 1908.)

Schilling, V.: Das Blutbild und seine Klin. Verwertung. Jena 1929.

Weidenreich: Die Leukozyten und verw. Zellarten. Wiesbaden 1911.

Lebenslauf.

Am 28. März 1910 wurde ich, Kurt Heinz Pimper, als Sohn des Reallehrers Friedrich Pimper zu Friedberg (Hessen) geboren. Nach zweijährigem Besuch der Volksschule wurde ich Ostern 1918 in die Vorklasse, Ostern 1919 in die Gymnasial-Sexta der Augustinerschule zu Friedberg aufgenommen und bestand am 14. März 1928 an derselben Anstalt die Reifeprüfung.

Mein medizinisches Studium begann ich im Sommersemester 1928 an der Universität Gießen, wo ich während meiner beiden ersten Semester auch an philosophischen Vorlesungen teilnahm. Im Sommer 1929 studierte ich in Wien, im folgenden Wintersemester kehrte ich nach Gießen zurück und bestand dort am 19. November 1930 die ärztliche Vorprüfung. Nach weiteren sechs Studiensemestern an den Universitäten München, Wien und Marburg, beendete ich mein medizinisches Staatsexamen am 12. Januar 1934 in Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Gießen: v. Aster, Behaghel, Becher, Bürker, Dieterich, Elbs, Feulgen, Henneberg, Honigmann, Horneffer, König, Küster, Messer, Möckelmann, Schmidt, Sommer, Storch, Weitz.

In Wien: Barrenscheen, Durig, Chvostek, Coronini, v. Eiselsberg, Frisch, Hamburger, Heidler, Hochstetter, Kazda, Kolmer, Kraul, Liebesny, Schaffer, Starlinger, O. Stein.

In München: Albrecht, Böhm, Borst, Bürkle de la Camp, Gebele, v. Müller, v. Zumbusch, Zweifel.

In Marburg: Baur, Boeminghaus, Eimer, Enke, Freudenberg, Göppert, Grüter, Hildebrand, Kehrer, Klapp, Klewitz, Kretschmer, Mauz, Naujoks, Neumann, Pfannenstiel, Ruete, Schwenkenbecher, Uffenorde, Versé, Wiedhopf.